

HENRIQUE JOSÉ POLATO GOMES

**INVESTIGAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A VARIANTE ATÍPICA DA
BUTIRILCOLINESTERASE E A SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE**

**CURITIBA
2007**

HENRIQUE JOSÉ POLATO GOMES

**INVESTIGAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A VARIANTE ATÍPICA DA
BUTIRILCOLINESTERASE E A SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE**

Trabalho de conclusão do Curso
de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná,
apresentado como requisito parcial
da disciplina de Estágio, para obtenção
do grau de Bacharel.

Orientador externo:
Prof.^a Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia
Colaborador interno:
Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza.
Colaborador externo:
Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

**CURITIBA
2007**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, QUADROS, GRÁFICOS E TABELAS	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1 HANSENÍASE: ASPECTOS GERAIS	7
1.1.1 Formas Clínicas	7
1.2 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À HANSENÍASE.....	8
1.3 BUTIRILCOLINESTERASE: ASPECTOS GERAIS E BREVE HISTÓRICO	10
1.4 MÉTODO DE FENOTIPAGEM POR INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	12
1.5 VARIANTE ATÍPICA DA BUTIRILCOLINESTERASE	13
1.6 RELAÇÃO ENTRE BUTIRILCOLINESTERASE E HANSENÍASE	17
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 MATERIAL.....	21
3.1.1 Amostra de Hansenianos	21
3.1.2 Escolha dos controles	23
3.2 METODOLOGIA.....	24
3.2.1 Coleta das amostras e extração do DNA	24
3.2.2 PCR (Reação em cadeia da polimerase)	24
3.2.3 PCR - SSCA (Análise conformacional de fita simples)	24
3.2.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida	25
3.2.3.2 Coloração do gel.....	25
3.2.4 Análise estatística dos resultados	27
3.2.4.1 <i>Odds Ratio</i>	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE FIGURAS, QUADROS, GRÁFICOS E TABELAS

Tabela 1: Variantes do gene <i>BCHE</i>	14
Tabela 2: Distribuição dos níveis de D.N. entre pacientes normais e hansenianos.....	17
Tabela 3: Porcentagem de inibição da butirilcolinesterase pela dibucaína (D.N.) entre pessoas normais e pacientes hansenianos da Etiópia.....	18
Tabela 4: Distribuição das datas de nascimento dos pacientes	21
Tabela 5: Distribuição das datas de diagnóstico dos pacientes.	22
Tabela 6: Classificação dos pacientes por grupo étnico.....	22
Tabela 7: Cidade de origem dos pacientes.	22
Tabela 8: Distribuição das datas de nascimento dos controles.	23
Tabela 9: Distribuição étnica dos controles.....	23
Figura 1: Exemplo de gel com três amostras de heterozigotos <i>70DG</i> destacadas.	26
Figura 2: Região ampliada de outro gel com quatro amostras de <i>70DG</i> em destaque.	27
Quadro 1: Representação esquemática do cálculo de <i>odds ratio</i>	27
Tabela 10: Frequências genotípicas e do alelo <i>70G</i> nas formas clínicas dos pacientes hansenianos.....	29
Gráfico 1: Frequências do alelo <i>70G</i> e de heterozigotos (<i>70DG</i>) em pacientes hansenianos, considerando-se formas clínicas da doença.....	30
Gráfico 2: Frequências (%) de heterozigotos (<i>70DG</i>), de homozigotos atípicos (<i>70GG</i>) e do alelo <i>70G</i> entre pacientes e controles.	31

RESUMO

A hanseníase, ou mal de Hansen, é uma doença granulomatosa e de grande cronicidade causada pelo agente etiológico *Mycobacterium leprae*, que afeta predominantemente o sistema nervoso periférico, podendo ocasionar perda da condução neural e, conseqüentemente, inúmeras lesões cutâneas. Há muito tempo se supõe que fatores hereditários participem da determinação da hanseníase, mas ainda pouco se sabe sobre sua herdabilidade e susceptibilidade. A butirilcolinesterase (BChE) é uma enzima sérica codificada pelo gene *BCHE*, para qual existem hipóteses que a associam ao metabolismo de lípidos, à proteção da acetilcolinesterase e à condução nervosa lenta. Por métodos de inibição enzimática, foram identificadas variantes da BChE que não possuíam o mesmo nível de inibição que a selvagem (usual). Uma das variantes identificadas ficou conhecida por atípica (*D70G*) e sugeriu-se uma correlação entre sua presença e o mal de Hansen, pelo fato de pacientes hansênicos apresentarem apnéia prolongada após uso do relaxante succinilcolina, que é hidrolisado pela BChE e causa esse mesmo distúrbio em indivíduos que possuem a variante atípica. Assim, o objetivo desse estudo foi verificar as frequências da mutação atípica (*D70G*) da BChE em pacientes com o mal de Hansen e em seus controles, analisando se há associação entre a presença dessa variante e a doença, e se há diferença entre as formas clínicas. Foram estudados 87 hansenianos (52 com a forma multibacilar e 35 com a paucibacilar) e 87 controles sem a doença, genotipados através da técnica de PCR-SSCA. Foram encontrados 10 heterozigotos *70DG* (11,5%) nos pacientes (6 nos multibacilares e 4 nos paucibacilares) e, nos controles, foram encontrados dois *70DG* e um homozigoto atípico, perfazendo um total de 3,4% de indivíduos com esta variante. Não houve diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles, quanto às frequências genótípicas e alélicas, provavelmente pelo pequeno tamanho das amostras. Quando a amostra de pacientes foi comparada com uma amostra de 361 doadores de sangue de Curitiba, as frequências genótípicas e alélicas foram significativamente mais altas em pacientes. Em vista disso, foi calculado o valor de *odds ratio*, que mostrou que heterozigotos *70DG* têm uma chance três vezes maior de contrair a doença do que os homozigotos selvagens. Esses resultados também poderiam ser devidos a outra variação do gene *BCHE*, em desequilíbrio de ligação com *D70G*, ou mesmo outro gene que apresente esse tipo de desequilíbrio de ligação. Assim, são necessários mais estudos com outras variantes da BChE e com amostras maiores de pacientes e controles. Entretanto, é possível que exista uma relação entre essa enzima e o mal de Hansen, uma vez que a variante atípica *D70G* não é tão eficiente na desintoxicação do organismo em relação a certas toxinas ambientais, como organofosforados, e pode vir a causar alterações no sistema imune.

ABSTRACT

Leprosy is a granulomatous chronic infectious disease, caused by the etiological agent *Mycobacterium leprae*, which affects the peripheral nervous system and, consequently, causes skin lesions. The heritability and susceptibility of the disease are not completely known, but it has been postulated for a long time that genetic factors play a role on this disease. Butyrylcholinesterase (BChE) is an enzyme coded by the *BCHE* gene, and is probably related to lipid metabolism, protection of acetylcholinesterase and slow neural conduction. By enzyme inhibition methods, some variants of BChE were identified in view of showing differential inhibition percentage when compared to that of the wild-type (usual) BChE. One of the variants was called atypical (*D70G*) and its presence leads to a prolonged duration of apnea (inhibition of neuromuscular transmission) induced by succinylcholine. The leprosy patients in whom succinylcholine was used as a muscle relaxant, had longer periods of apnea than other individuals and, because of this fact, an association between BChE and leprosy was suggested. Therefore, the aims of this study were to estimate the frequencies of the atypical variant (*D70G*) in leprosy patients and compare to the frequencies found in healthy individuals (controls), verifying if there is an association of this variant with the disease and if this association differs between the clinic manifestations of the disease. 87 patients (52 multibacillary and 35 paucibacillary) and 87 healthy controls were analyzed by PCR-SSCA. Ten *70DG* heterozygotes (11,5%) were found in patients (6 multibacillary and 4 paucibacillary) and, in the healthy group, two *70DG* heterozygotes and one atypical homozygote were found, showing 3,4% of individuals with this variant. There was no statistical significant difference in genotype and allele frequencies between patients and controls, probably because of the small sample size. When the patients data were compared to a sample of 361 blood donors of Curitiba, both frequencies were higher in the patients group. In view of this result, *odds ratio* was calculated and it showed that the heterozygote *70DG* has a three times higher chance of develop leprosy than the wild-type homozygote. These results could have been due to a different variant of the *BCHE* gene, in linkage disequilibrium with *D70G*, or even by another gene in linkage disequilibrium with the *BCHE* gene. So, additional studies with other variants of the *BCHE* gene and with a larger sample are necessary. However, an association between the atypical variant and leprosy is not improbable, considering that the *D70G* variant is not so efficient in the detoxication of environmental toxins and could cause malfunctions in the immune system.

1. INTRODUÇÃO

1.1 HANSENÍASE: ASPECTOS GERAIS

A hanseníase, ou mal de Hansen, é uma doença bacteriana causada pelo agente etiológico *Mycobacterium leprae* e afeta predominantemente o sistema nervoso periférico, podendo ocasionar uma perda significativa da condução neural e, em consequência, inúmeras lesões cutâneas (BENNET e PLUM, 1997).

As respostas à doença são idiossincráticas e dependem fundamentalmente da capacidade de mobilizar uma resposta imune contra o agente e seus antígenos. Assim, nos indivíduos que adoecem, a infecção ocorre e evolui de diferentes formas de acordo com suas respostas imunológicas específicas (SOUZA, 1997), tanto para a doença *per se*, quanto para suas diferentes formas clínicas.

Historicamente, poucas doenças causaram um estigma social tão grande quanto o mal de Hansen. Hoje em dia, a hanseníase afeta aproximadamente 600.000 novos indivíduos por ano ao longo do mundo (MIRA, 2006). A origem desses novos casos não está bem esclarecida, pois não há reservatório natural conhecido de relevante importância biológica para o *M. leprae*. Por muito tempo, a doença permaneceu considerada incurável, mas com os tratamentos atuais já é considerada como passível de cura. O tratamento oferecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é gratuito e 100% eficaz quanto à cura da doença.

O Brasil, embora comece a apresentar um declínio na taxa de novos casos registrados, ainda apresenta uma alta prevalência da doença, ficando apenas atrás da Índia e de algumas regiões da África (WHO, 2005). Segundo dados da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, no primeiro semestre de 2006, o Paraná mostrou prevalência de 0,74/10.000 habitantes e 701 casos novos, sendo considerado, portanto, um estado hiperendêmico (SAÚDE, 2007).

1.1.1 Formas Clínicas

O diagnóstico da hanseníase se dá fundamentalmente pela análise de alguns sinais, como: lesões cutâneas decorrentes de ferimentos reincidentes, cuja ocorrência é favorecida pela anestesia característica da doença, espessamento de nervos periféricos, e aparecimento do *M. leprae* em esfregaço de linfa ou cortes histológicos (SOUZA, 1997).

Entretanto, sua manifestação clínica é bastante heterogênea. O critério clássico de classificação das formas clínicas da doença é o proposto por RIDLEY E JOPLING (1966), que analisa aspectos clínicos e bacteriológicos da doença, mas também enfatiza seus aspectos imunológicos e patológicos. Assim, o paciente afetado pode apresentar um espectro de manifestações que varia entre as formas polares tuberculóide-tuberculóide (TT), que é mais branda e localizada, e lepromatosa-lepromatosa (LL), sistêmica e mais severa.

A hanseníase tuberculóide caracteriza-se por presença de poucas lesões bem definidas de pele, raramente detectam-se bacilos em biópsia de pele e nervos, e presença de forte resposta imunológica celular tipo Th1 anti-*M. leprae*. Por sua vez, pacientes com hanseníase lepromatosa comumente apresentam numerosas lesões inicialmente mal definidas de pele, com presença abundante de bacilos e anergia a antígenos do *M. leprae* (RIDLEY E JOPLING, 1966). As formas tuberculóide e lepromatosa da doença correspondem, aproximadamente, aos tipos de hanseníase paucibacilar e multibacilar, respectivamente, propostos pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1982) com fins terapêuticos.

1.2 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À HANSENÍASE

O mal de Hansen é uma doença granulomatosa e de longa cronicidade, e embora se reconheça a relativa baixa infectividade da doença, pouco se sabe sobre os fatores que potencialmente influenciariam a sua susceptibilidade. Há muito se supõe que a hanseníase seja hereditária, mas os estudos mais modernos só começaram após os primeiros registros do mal de Hansen em irmãos gêmeos. CHAKRAVARTTI e VOGEL (1973 *apud* MIRA, 2006) realizaram um grande estudo com gêmeos indianos cujo resultado indica fortemente um fator genético controlando a susceptibilidade, tanto à doença propriamente dita, quanto às diferentes formas clínicas.

Vários estudos já foram realizados testando, tanto a distribuição familiar, quanto diferentes sistemas polimórficos em populações de hansenianos, mas poucos foram os resultados efetivamente conclusivos. Isso, até certo ponto era esperado, visto que na maioria das investigações, a escolha dos sistemas genéticos era aleatória (BEIGUELMAN, 2002). Ainda assim, análises complexas de segregação indicam a existência de componentes genéticos controlando a susceptibilidade à doença, ainda que algumas dessas análises apresentem

resultados divergentes quanto aos efeitos dos genes (ABEL e DEMENAIIS, 1988; FEITOSA e cols., 1995).

Atualmente, grande parte dos estudos trabalha com genes candidatos buscando explicar os fatores genéticos que influenciariam de alguma forma a infecção e o desenvolvimento do mal de Hansen, isto é, que estariam associados com a doença ou de alguma forma relacionados com os fenótipos da hanseníase. Entre os genes candidatos estudados, podem-se citar: *VDR* – receptor de vitamina D; 12q13.11 (ROY e cols., 1999), *NRAMP1* atualmente denominado de *SLC11A1* – membro 1 da família 11 carreadora de soluto; simporte de sódio/fosfato; 2q35 (ABEL e cols., 1998; ALCAIS e cols., 2000), *TLR2* - *toll-like* receptor 2; 4q32 (KANG e cols., 2000).

Estes estudos sustentam a hipótese de que o controle genético da doença pode ocorrer em duas situações, com genes influenciando susceptibilidade à hanseníase *per se* e genes influenciando sua evolução nas diferentes formas clínicas.

Um estudo, que realizou um rastreamento genômico completo, em uma população vietnamita, identificou um novo loco relacionado com a susceptibilidade à hanseníase *per se*, localizado no cromossomo 6q25-q27. O mesmo trabalho confirmou, na população Vietnamita, a existência de um loco no cromossomo 10p13 atuando como modificador para a forma paucibacilar da doença (MIRA e cols., 2003). Esse loco já havia sido descrito em outro rastreamento genômico, realizado em uma coleção de famílias da Índia, que possuíam a forma paucibacilar (SIDDIQUI e cols., 2001), mas não havia ficado claro se a associação era com a susceptibilidade à doença propriamente dita, ou se influenciaria sua forma clínica.

A construção de um mapa de desequilíbrio de ligação do segmento genômico, localizado sob o pico de ligação do cromossomo 6q25-q27, resultou na identificação de um bloco em desequilíbrio de ligação de 80 kb, contendo variantes genéticas de dois genes, *PARK2* e *PACRG*, envolvidas no controle da susceptibilidade à hanseníase *per se* na população vietnamita. O achado foi replicado e confirmado em um amplo estudo caso-controle em uma amostra populacional brasileira (MIRA e cols., 2004). Esse estudo demonstrou, pela primeira vez, que pesquisas sistemáticas de associação, considerando genes candidatos localizados em regiões previamente identificadas por rastreamentos genômicos, podem ser úteis para a descoberta de novos genes associados a diversos fatores relativos a doenças infecciosas (MIRA e cols., 2003, 2004).

No presente trabalho o gene candidato, que foi testado, é o gene *BCHE* (3q26.1-q26.2), que codifica a enzima butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8), uma vez que a presença de uma de suas variantes pode estar associada à susceptibilidade à hanseníase.

1.3 BUTIRILCOLINESTERASE: ASPECTOS GERAIS E BREVE HISTÓRICO

A butirilcolinesterase (BChE) é uma enzima sérica que é produzida no fígado e nos adipócitos. Embora possua uma ampla distribuição no organismo, suas funções fisiológicas ainda não estão completamente conhecidas.

Sabe-se que a BChE é uma esterase que pode se apresentar sob várias formas moleculares e que muitas variantes genéticas, em geral raras, já foram descritas (revisão em SOUZA, 2001). Sua capacidade de hidrolisar inúmeros ésteres de colina é bem conhecida, entretanto seu substrato natural não foi plenamente elucidado. Há hipóteses que relacionam a BChE ao metabolismo de lípidos, à proteção da acetilcolinesterase e à condução nervosa lenta (WHITTAKER, 1980, 1986; KUTTY, 1980; *apud* MIKAMI 2005).

Na realidade, foi o interesse pelos agentes químicos responsáveis pela condução nervosa que possibilitou o descobrimento da butirilcolinesterase, pois após estudos que levaram à descoberta da acetilcolinesterase (AChE), que é responsável pela rápida degradação do neurotransmissor acetilcolina, ALLES E HAWES (1940) concluíram que a colinesterase presente no plasma (BChE) possui características e propriedades diferentes da colinesterase presente nas hemácias (AChE), uma vez que essa hidrolisa apenas ésteres de colina, enquanto a BChE, além de hidrolisar ésteres de colina, também o faz com uma série de ésteres não colinérgicos.

A AChE foi, e ainda é, mais estudada que a BChE, devido a sua importância na neurotransmissão colinérgica, enquanto que a BChE é fundamentalmente estudada pela sua importância no metabolismo de xenobióticos (revisão em CHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA, 2007), que são substâncias químicas exógenas, ocasionalmente encontradas no organismo, mas cuja presença e produção não são aí esperadas. Também pode incluir substâncias cuja concentração se encontra consideravelmente maior que a esperada (ISCID, 2007).

O primeiro estudo, considerando um xenobiótico e a BChE, foi com a substância succinilcolina, que possui efeito semelhante ao curare, isto é, age como um relaxante muscular, sendo usada no pré-operatório, em casos de anestesia geral. Isto ocorre pelo fato da

succinilcolina atuar na musculatura estriada, agindo como antagonista competitivo da acetilcolina e bloqueando seus receptores, o que, por consequência, impede a contração muscular (BOTGARD, 2007).

Daniel Bovet e sua equipe reconheceram as propriedades da succinilcolina, como relaxante muscular, em 1949. Além disso, também perceberam a conspícua tolerância que o organismo possui a essa droga, que se deve fundamentalmente à hidrólise da succinilcolina pela BChE. Esta hidrólise tem como produtos a acetilcolina e o ácido succínico, ambos com baixa toxicidade; o que faz com que o efeito da succinilcolina tenha curta duração e permite essa tolerância por parte do organismo (BOVET, 1957; *apud* CHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA, 2007).

Desta maneira, a succinilcolina passou a ser indicada para uso em casos de necessidade de um relaxante muscular de efeito curto e até mesmo em procedimentos cirúrgicos longos, variando-se a via de administração. Mas, embora uma apnéia curta de cerca de dois a seis minutos seja esperada após a ingestão de 1 mg da droga por kg do indivíduo, alguns casos de apnéia dita prolongada, que chegavam a durar várias horas, foram descritos após seu uso.

Considerando-se que já havia sido demonstrado que a BChE hidrolisa a succinilcolina, levantou-se a hipótese que os pacientes que apresentavam esta apnéia prolongada, isto é, que possuíam uma maior sensibilidade a essa droga, provavelmente apresentavam um nível menor de atividade da BChE que pessoas que não apresentavam essa sensibilidade. Isso foi analisado e demonstrado por BOURNE e cols. (1952) e EVANS e cols. (1952), que encontraram, de fato, uma menor atividade da BChE em pacientes com apnéia prolongada. FORBAT e cols. (1953; *apud* CHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA, 2007), além de descreverem uma baixa atividade da enzima em um paciente com apnéia prolongada, também a descreveram em seu irmão, o que lhes permitiu inferir que poderia haver algum fator genético que determinasse esse decréscimo de atividade.

Ainda assim, mesmo com estes dados conduzindo à idéia de um fator genético, apenas os valores referentes à atividade enzimática não foram seguros o suficiente para poder discernir fenótipos. A classificação fenotípica só passou a ser possível em 1957, quando dois pesquisadores, Kalow e Genest, criaram um teste de inibição enzimática que permitiu classificar fenótipos, por meio da porcentagem de inibição (KALOW e GENEST, 1957).

1.4 MÉTODO DE FENOTIPAGEM POR INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Nos casos de maior sensibilidade à succinilcolina, sugeriu-se que deveria haver uma variação atípica da BChE (KALOW, 1956). Foi a partir do método desenvolvido para detectar a presença dessa possível variante atípica, que se passou a classificar os indivíduos fenotipicamente (revisão em CHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA, 2007). Este teste consiste em adicionar uma concentração de inibidor a uma solução onde estariam a BChE, um tampão e um substrato sobre o qual a enzima deveria agir e, posteriormente, analisar a porcentagem da enzima que teria, de fato, sofrido a inibição enzimática, em comparação à sua ação em um ensaio controle sem a presença do inibidor.

KALOW e STARON (1957) utilizaram-se dessa metodologia, tendo como inibidor o anestésico local dibucaína. Dessa maneira, submeteram uma alíquota de soro humano diluído à presença do inibidor, e a atividade da BChE foi mensurada por um espectrofotômetro de alcance na faixa ultravioleta.

A concentração de 10^{-5} M do inibidor utilizada e descrita no teste em questão permitiu a distinção de dois fenótipos diferentes, e conseqüentemente, possibilitou o discernimento das duas BChEs, pois a chamada usual (selvagem) apresentou uma inibição de cerca de 79%, enquanto que a denominada atípica, apresentou inibição de apenas 19%. Por isso, essa concentração passou a ser base para os testes descritos, e o grau de inibição, expresso em porcentagem, passou a ser denominado “Número de Dibucaína” ou D.N. (KALOW e STARON, 1957).

Outros inibidores, como a neostigmina, também podem ser utilizados para este procedimento com resultados similares, mas a dibucaína foi preferida em virtude de sua ação imediata sobre a enzima. Propôs-se que os D.Ns. se classifiquem três grupos: homozigotos usuais com D.N. superior a 70, isto é, mais de 70 % das moléculas da BChE são inibidas; homozigotos atípicos com D.N. inferior a 20, ou seja, menos de 20% de inibição, e os D.Ns. com valores entre 40 e 70 seriam próprios dos heterozigotos. Não foram encontrados valores de D.N. entre 20 e 40 (KALOW e STARON, 1957).

Com estes resultados, tornou-se clara a ocorrência de uma forma dita atípica, que apresenta, em média, um nível de atividade menor que a forma usual da enzima, e que possui uma menor porcentagem de inibição diante de inibidores positivamente carregados.

1.5 VARIANTE ATÍPICA DA BUTIRILCOLINESTERASE

A forma atípica da BChE, também chamada de resistente à dibucaína, foi sua primeira variante genética a ser detectada. A incapacidade da variante atípica em hidrolisar a succinilcolina deve-se a sua baixa afinidade aos ésteres de colina, que normalmente se ligariam ao sítio aniônico da enzima. Todavia, como a variante atípica não apresenta uma menor afinidade a ésteres orgânicos neutros, que interagem com o sítio esterásico da BChE, propôs-se que essa variante representa uma alteração estrutural no sítio aniônico.

McGUIRE e cols. (1989) mostraram que a variante atípica é ocasionada por uma mutação de ponto no nucleotídeo 209 (exon 2) do gene *BCHE*. Isso acarreta uma substituição do ácido aspártico 70 (GAT) por uma glicina (GGT), ou seja, a substituição de um aminoácido ácido por um aminoácido neutro, o que explica sua perda de afinidade por substratos positivamente carregados (McGUIRE e cols., 1989).

Também conhecida por mutação A ou *p.D70G*, no presente trabalho a mutação será predominantemente tratada por *D70G*, sendo resultante de mudança no nucleotídeo 209 (*209A>G*). Assim, a variante usual da BChE será tratada por *70D*: *70DD* será o homozigoto usual ou selvagem, *70GG* o homozigoto atípico e *70DG*, o heterozigoto. Os alelos serão denominados *70D* e *70G*.

Na população caucasóide, o alelo *70G* tem, em média, uma frequência aproximadamente de 2% tanto evidenciado por métodos de inibição enzimática (WHITTAKER, 1986), como por análise do DNA (MIKAMI e cols., 2008). Nesse projeto, foi analisada apenas essa variante do gene *BCHE*, que é polialélico (Tabela 1) e que apresenta poucas variações com frequência igual ou superior a 1%, características de variações polimórficas.

É preciso levar em consideração que existem outras variantes em desequilíbrio de ligação com a mutação atípica e que podem exercer alguma influência na associação com a hanseníase. Entre essas variantes, é interessante citar a *K* (*539T*) (BARTELS e cols., 1992b), pois a variante *70G* é encontrada preferencialmente na conformação cis com *539T*. Além desta, a variante –*116A* se encontra preferencialmente na conformação cis com a variante *K* (BARTELS e cols., 1990), tendo sido associada à diminuição de cerca de 30% na atividade da BChE (FURTADO e cols., 2008). Entretanto, a variante –*116A* encontra-se preferencialmente em cis com *70D* (NUNES, 2007). As frequências de *539T* e de –*116A* em Curitiba são, respectivamente, de 18% (SOUZA e cols., 1998) e de 9% (FURTADO e cols., 2008).

Tabela 1: Variantes do gene *BCHE*^a

Nível de DNA ^b	Nível de Proteína ^c	Referência
<i>Exon 1</i>		
<i>c.-116G>A</i>		Bartels e cols. (1990)
<i>Exon 2</i>		
<i>c.9_11delCAT</i>	<i>p.I4del</i>	Maekawa e cols. (1997)
<i>c.16delA</i>	<i>p.I6fs</i>	Bartels e cols. (1992b) Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>c.35^A>G</i>	<i>p.K12R</i>	Mikami e cols.(2008)
<i>c.45G>C</i>	<i>p.G15G</i>	Mikami e cols. (2008)
<i>c.71C>T</i>	<i>p.T24M</i>	Maekawa e cols. (1997)
<i>c.82T>A</i>	<i>p.F28I</i>	Yen e cols. (2003)
<i>c.98^A>G</i>	<i>p.Y33C</i>	Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>c.109C>T</i>	<i>p.P37S</i>	Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>c.208G>C</i>	<i>p.D70H</i>	Boeck e cols. (2002)
<i>c.209A>G</i>	<i>p.D70G (A)</i>	McGuire e cols. (1989)
<i>c.223G>C</i>	<i>p.G75R</i>	Souza e cols. (2005)
<i>c.270A>C</i>	<i>p.E90D</i>	Souza e cols. (2005)
<i>c.286A>T</i>	<i>p.N96Y</i>	Yen e cols. (2003)
<i>c.297T>G</i>	<i>p.I99M</i>	Souza e cols. (2005)
<i>c.298C>T</i>	<i>p.P100S</i>	Maekawa e cols. (1997) Takagi e cols. (1997); Lu e cols. (1997)
<i>c.318_319insA</i>	<i>p.N106fs</i>	Yen e cols. (2003); On-Kei Chan e cols. (2005)
<i>c.344G>A</i>	<i>p.G115D</i>	Primo-Parmo e cols. (1997)
<i>c.351_353insAG</i>	<i>p.G117fs</i>	Nogueira e cols. (1990)
<i>c.355C>T</i>	<i>p.Q119X</i>	Sudo e cols. (1996)
<i>c.375A>T</i>	<i>p.L125F</i>	Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>c.383A>G</i>	<i>p.Y128C</i>	Hidaka e cols. (1997a)
<i>c.424G>A</i>	<i>p.V142M (H)</i>	Jensen e cols. (1992)
<i>c.486T>C</i>	<i>p.A162A</i>	Souza e cols. (2005)
<i>c.510T>G</i>	<i>p.D170E</i>	Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>c.514C>T</i>	<i>p.Q172X</i>	Gätke e cols. (2001)

Tabela 1: Variantes do gene *BCHE*^a (continuação)

Nível de DNA ^b	Nível de Proteína ^c	Referência
<i>c.551C>T</i>	<i>p.A184V (SC)</i>	Greenberg e cols. (1995)
<i>c.592A>G</i>	<i>p.S198G</i>	Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>c.596G>T</i>	<i>p.A199nesse</i>	Sakamoto e cols. (1998)
<i>c.601G>A</i>	<i>p.A201T</i>	Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>c.607 T>C</i>	<i>p.S203P</i>	Hidaka e cols. (2001)
<i>c.728C>T</i>	<i>p.T243M (F-1)</i>	Nogueira e cols. (1992)
<i>c.748A>C</i>	<i>p.T250P</i>	Maekawa e cols. (1995)
<i>c.765G>C</i>	<i>p.E255D</i>	Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>c.800A>G</i>	<i>p.K267R</i>	Maekawa e cols. (1997)
<i>c.811G>T</i>	<i>p.E271X</i>	Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>c.880G>A</i>	<i>p.V294M</i>	Mikami e cols. (2008)
<i>c.920T>C</i>	<i>p.L307P</i>	Manoharan e cols. (2006)
<i>c.943_943insA</i>	<i>p.T315fs</i>	Hidaka e cols. (1992)
<i>c.943A>T</i>	<i>p.T315S</i>	Liu e cols. (2002)
<i>c.988T>A</i>	<i>p.L330I</i>	Sudo e cols. (1997)
<i>c.997G>T</i>	<i>p.G333C</i>	Mikami e cols. (2008)
<i>c.1062 _1076insALU</i>	<i>p.K355insALU</i>	Muratani e cols. (1991); Maekawa e cols. (2004)
<i>c.1093G>C</i>	<i>p.G365R</i>	Hada e cols. (1992); Hidaka e cols. (1992)
<i>c.1156C>T</i>	<i>p.R386C</i>	Yen e cols. (2003)
<i>c.1169G>T</i>	<i>p.G390V (F-2)</i>	Nogueira e cols. (1992)
<i>c.1200C>A</i>	<i>p.C400X</i>	Hidaka e cols. (1997b)
<i>c.1253T>C</i>	<i>p.F418S</i>	Maekawa e cols. (1995)
<i>c.1270C>T</i>	<i>p.R424X</i>	Yen e cols. (2003)
<i>c.1273T>C</i>	<i>p.S425P</i>	Gnatt e cols. (1990)
<i>c.1294G>T</i>	<i>p.E432X</i>	Levano e cols. (2005)
<i>c.1303G>A</i>	<i>p.G435R</i>	Dey e cols. (1997)
<i>c.1336T>G</i>	<i>p.F446nesse</i>	Dey e cols. (1998)

Tabela 1: Variantes do gene *BCHE*^a (continuação)

Nível de DNA ^b	Nível de Proteína ^c	Referência
<i>c.1351G>T</i>	<i>p.E451X</i>	Dey e cols. (1998)
<i>c.1378G>A</i>	<i>p.E460K</i>	Yen e cols. (2003)
<i>c.1393A>T</i>	<i>p.R465X</i>	Maekawa e cols. (1995)
<i>c.1408C>T</i>	<i>p.R470W</i>	Mikami e cols. (2008)
<i>c.1411T>C</i>	<i>p.W471R</i>	Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>c.1420T>C</i>	<i>p.F474L</i>	On-Kei Chan e cols. (2005)
<i>Íntron 2</i>		
<i>c.IVS2-8T>G</i>		Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>Exon 3</i>		
<i>c.1490A>T</i>	<i>p.E497V (J)</i>	Bartels e cols. (1992 ^a)
<i>c.1500T>A</i>	<i>p.Y500X</i>	Bartels e cols. (1992b); Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>c.1543C>T</i>	<i>p.R515C</i>	Maekawa e cols. (1995)
<i>c.1553A>T</i>	<i>p.Q518L</i>	Primo-Parmo e cols. (1996)
<i>Íntron 3</i>		
<i>c.IVS3-14T>C</i>		Parmo-Folloni e cols. (2008)
<i>Exon 4</i>		
<i>c.1615G>A</i>	<i>p.A539T (K)</i>	Bartels e cols. (1992b)
<i>c.1719_1720delT</i>	<i>p.L574fsX576</i>	Parmo-Folloni e cols. (2008)
<i>c.*189A>G</i>		Bartels e cols. (1990)

FONTE: ^aCHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA, 2007 (atualizado); ^bGlu 1 é o amino ácido N-terminal da BChE madura e o nt 1 corresponde ao primeiro nucleotídeo no códon para Glu 1; ^cNome trivial entre parênteses.

1.6 RELAÇÃO ENTRE BUTIRILCOLINESTERASE E HANSENÍASE

Há muito tempo, especula-se sobre uma possível relação existente entre a BChE e a hanseníase, e existem evidências que sustentaram primeiramente essa hipótese, como por exemplo a ocorrência de apnéia prolongada em hansenianos, após utilização do relaxante muscular succinilcolina (VARKEY, 1968, observações não publicadas; *apud* THOMAS e cols., 1976). Na época em que os primeiros estudos sobre o nível de atividade da BChE foram realizados em hansenianos, já se possuía o conhecimento da existência de variantes não usuais da BChE e o propósito desses estudos era comparar os níveis da atividade enzimática em indivíduos saudáveis e em pacientes afetados, com a finalidade de se elucidar possíveis fatores genéticos da hanseníase (THOMAS e JOB, 1972).

A metodologia utilizada nesses estudos era a da inibição enzimática pelo uso da dibucaína, estimando-se o D.N. para a classificação dos fenótipos (KALOW e GENEST, 1957). Com essa metodologia, diferentes resultados foram achados.

THOMAS e cols. (1976) encontraram diferença estatisticamente relevante entre as distribuições dos fenótipos da BChE no total de afetados, quando comparadas com controles normais ($p < 0,001$), em amostras coletadas na Índia. Além disso, quando foram comparadas as frequências de heterozigotos e de homozigotos usuais entre o grupo tuberculóide e o grupo controle, a diferença foi significativa ($p < 0,001$). Entretanto não houve diferença significativa entre o grupo controle e o tuberculóide, quando se consideraram os homozigotos atípicos. Houve diferença significativa quando os grupos tuberculóide e lepromatoso foram comparados em relação aos três grupos de D. N., conforme pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2: Distribuição dos níveis de D.N. entre pacientes normais e hansenianos.

Tipo de amostra	D. N.						
	> 70 (usual)		40-70 (heterozigoto atípico)		Abaixo de 40 (homozigoto atípico)		Total
	No.	%	No.	%	No.	%	
Normais	701	97,36	18	2,50	1	0,14	720
Hansenianos¹							
Lepromatoso	209	49,78	183	43,57	28	6,60	420
Tuberculóide	191	63,46	108	35,88	2	0,66	301
Total	400	55,48	291	40,36	30	4,16	721

¹Classificados de acordo com Ridley (*apud* RIDLEY E JOPLING, 1966). Fonte: THOMAS e cols. (1976).

AGARWAL e cols. (1973) por sua vez, encontraram distribuições semelhantes, quanto às variações usual e atípica, tanto comparando controles normais com pacientes hansenianos, quanto comparando as diferentes formas clínicas da doença, conforme pode ser visto na tabela 3.

Tabela 3: Porcentagem de inibição da butirilcolinesterase pela dibucaína (D.N.) entre pessoas normais e pacientes hansenianos da Etiópia.

D. N.							
Tipo de amostra	> 70 (usual)		40-70 (heterozigoto atípico)		Abaixo de 40 (homozigoto atípico)		Total
	No.	%	No.	%	No.	%	
Normais	142	94,70	7	4,70	1	0,66	150
Hansenianos							
Lepromatoso	101	96,20	4	3,80			105
Tuberculóide	85	96,60	3	3,40			88
Borderline	12	92,30	1	7,70			13

Fonte: Agarwal e cols. (1973).

THOMAS E JOB (1972) já haviam achado um resultado semelhante ao encontrado em seu trabalho de 1976. Por sua vez, SUNEETHA e cols. (2004) não obtiveram decréscimo nos níveis de BChE em pacientes hansenianos se comparados com controles normais, mas não consideraram as variantes da BChE para o estudo.

WHITTAKER e cols. (1976) estudaram outras variantes da BChE além da atípica em amostra africana da Rodésia. Em sua amostra de pacientes afetados, não acharam nenhum paciente com o gene para a variante atípica; além disso, atentam para o fato de que nenhum dos estudos anteriores incluíram dados sobre a incidência da variante resistente ao fluoreto, sugerindo inclusive que alguns dos genótipos encontrados por THOMAS e cols. (1976) poderiam portar o gene de resistência ao fluoreto. Ainda assim, embora tenham estudado outras variantes do gene, concluíram que não havia diferença significativa nas frequências alélicas de pacientes hansenianos (WHITTAKER e cols., 1976).

O confronto desses diferentes resultados gera dúvida quanto à existência efetiva de uma associação entre a presença da variante atípica da BChE e a hanseníase. É possível que a presença do alelo 70G possa deixar o indivíduo mais susceptível à doença. Entretanto, os resultados discordantes podem ser devidos à metodologia utilizada para a fenotipagem, que eventualmente pode ter sido afetada por medicação usada pelos pacientes (WHITTAKER e cols., 1976). Além disso, pacientes com hanseníase podem apresentar granulomatose ou danos nas

células parenquimáticas no fígado, o que levaria a um decréscimo nos níveis da BChE, com possibilidade de afetar o resultado da fenotipagem (BULAKH e cols., 1985).

Em suma, quando pacientes afetados foram comparados com controles normais foram achadas tanto diferenças significativas quanto à presença da mutação *D70G*, como o contrário. Foram encontrados níveis elevados de colinesterases (BChE e AChE) não apenas no soro de pacientes, mas também nos seus nervos e em sua pele (SUNEETHA e cols., 2002), como ausência de diferenças nestes níveis. Dessa forma, os dados já publicados são inconclusivos para se postular se a BChE pode, de alguma forma, aumentar a susceptibilidade à hanseníase.

Por isso, o propósito desse trabalho é comparar pacientes hansenianos e controles sem a doença, quanto à associação com a variante *70G*, neste caso determinada por exame do próprio DNA. Espera-se obter, com essa metodologia, uma tipagem mais confiável e uma contribuição no que tange à existência ou não de associação entre a variante *70G* do gene *BCHE* e o mal de Hansen, em amostras brasileiras.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho propõe-se a:

- 1 – Verificar as frequências da mutação atípica (*D70G*) da butirilcolinesterase em indivíduos afetados pelo mal de Hansen e em seus controles;
- 2 – Verificar se a hanseníase está associada à presença da mutação *D70G*, detectada por análise de DNA;
- 3 – Analisar se há associação de *D70G* na susceptibilidade às diferentes formas clínicas da hanseníase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Neste projeto foi utilizada uma amostra caso-controle de 87 hansenianos e 87 controles escolhidos ao acaso a partir de material coletado sob a orientação do Dr. Marcelo Mira da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Esta amostra foi coletada em diversas cidades do estado do Paraná.

Por se tratar de uma análise populacional, excluíram-se os indivíduos consangüíneos. Foram incluídos oito controles com histórico de consangüíneos com hanseníase, os quais não fizeram parte da amostra de pacientes.

3.1.1 Amostra de Hansenianos

O diagnóstico clínico e laboratorial, bem como a classificação dos tipos clínicos da hanseníase da população paranaense, foram feitos por médicos especialistas do Serviço de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia/Aliança Saúde e da Fundação Pró Hansen.

A idade dos pacientes não foi critério de exclusão dos mesmos, sendo a média de idade de $50,87 \pm 1,60$ anos; o paciente mais jovem possui 6 anos (nascido em 2001) e o paciente com mais idade, 77 anos (nascido em 1930). Apenas um paciente não teve sua data de nascimento identificada (Tabela 4).

Tabela 4: Número e porcentagem de pacientes por data de nascimento.

Data	Número de Pacientes	%
1921 a 1940	12	13,79
1941 a 1960	47	54,02
1961 a 1980	22	25,29
1981 a 2000	4	4,60
2001 em diante	1	1,15
Sem informação	1	1,15
Total	87	100,00

Entretanto, embora a maior porcentagem dos nascimentos tenha sido entre 1941 e 1960 (54,02%), as datas dos diagnósticos são bem mais recentes, conforme pode ser visto na tabela 5. Três pacientes não tiveram a data do diagnóstico identificada.

Tabela 5: Número e porcentagem de pacientes por data de diagnóstico.

Data	Número de Pacientes	%
1971 a 1980	2	2,30
19810 a 1990	3	3,45
1991 a 2000	17	19,54
2001 em diante	62	71,26
Sem informação	3	3,45
Total	87	100,00

O sexo também não foi fator de exclusão para a composição do grupo, sendo que dos 87 pacientes analisados, 44 eram homens e 43 eram mulheres, compondo uma amostra com número semelhante de cada sexo. A distribuição étnica está mostrada na tabela 6, onde se observa que a contribuição predominante é de caucasóides.

Tabela 6: Número e porcentagem de pacientes por grupo étnico.

Grupo étnico	Número de Pacientes	%
Branco	66	75,86
Pardo	13	14,94
Negro	5	5,75
Sem informação	3	3,45
Total	87	100,00

Os pacientes são oriundos de cinco cidades do Paraná: Curitiba e região metropolitana (25°25'40" S e 49°16'23" W), sendo tratados pela Fundação Pró Hansen; Prudentópolis (25°12'47" S e 50°58'40" W); Pato Branco (26°13'46" S e 52°40'14" W); Piraquara (25°26'30" S e 49°03'08" W) e São Jerônimo da Serra (23°43'40" S e 50°44'27" W), conforme pode ser visto na tabela 7.

Quanto às formas clínicas, foram analisados 35 pacientes com a forma paucibacilar (40,23%) e 52 com a forma multibacilar (59,77%) da doença.

Tabela 7: Número e porcentagem de pacientes por cidade de origem.

Cidade	Número de Pacientes	Porcentagem
Curitiba (Fundação Pró Hansen)	47	54,02
Prudentópolis	19	21,84
Pato Branco	6	6,90
Piraquara	3	3,45
São Jerônimo	12	13,79
Total	87	100,00

3.1.2 Escolha dos controles

Os controles foram selecionados tendo como critério o fato de terem convivido com hansenianos, mas não terem contraído o *M. leprae* e, conseqüentemente, não ter desenvolvido a doença. Além disso, é importante que o controle escolhido não tenha grau de consangüinidade com pacientes estudados nessa amostra, para que não haja correlação genética entre eles e, assim, se possa realizar uma análise populacional. Procurou-se ter uma distribuição étnica da amostra controle o mais semelhante possível à da amostra de pacientes.

Todos os controle são oriundos da cidade de Piraquara, PR, onde se localiza o Hospital São Roque, que trata de pacientes com a doença. Os controles são funcionários desse hospital, trabalham em suas imediações ou são moradores vizinhos do hospital.

A idade média dos controles é de $44,48 \pm 1,94$ anos, sendo que o controle mais jovem possui 9 anos (nascido em 1998) e o com mais idade, 82 anos (nascido em 1925). A distribuição de idade dos controles está na tabela 8.

Tabela 8: Número e porcentagem dos controles por datas de nascimento.

Data	Número Controles	%
1921 a 1940	11	12,64
1941 a 1960	31	35,63
1961 a 1980	31	35,63
1981 a 2000	14	16,10
Total	87	100,00

Quanto ao sexo, os controles são representados por 35 homens (40,2%) e 52 mulheres (59,8%) e, no que tange à distribuição da etnia, a amostra é bastante semelhante à dos pacientes (tabela 9).

Tabela 9: Número e porcentagem de controles por grupo étnico.

Classificação	Número de Controles	%
Branco	67	77,01
Pardo	15	17,24
Negro	5	5,75
Total	87	100,00

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Coleta das amostras e extração do DNA

O DNA utilizado nas análises foi obtido a partir de sangue total. Foram coletados 5 mL de sangue por punção venosa em tubos do tipo vacutainer® contendo EDTA como anticoagulante, em condições ideais de assepsia.

O DNA foi extraído das amostras de sangue total pelo método de *salting out* (MILLER e cols., 1988). As amostras de DNA obtidas foram armazenadas em freezer a -80°C, como soluções estoque. A concentração das soluções estoque foram determinadas por espectrofotometria, e as amostras foram diluídas para uso a uma concentração aproximada de 20 ng/μL. As soluções de DNA utilizadas para as análises foram armazenadas em freezer a -20°C.

3.2.2 PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Para cada amostra foi amplificado um segmento de DNA de 193pb (do nucleotídeo 155 ao 347), que contém o nucleotídeo 209 para permitir a detecção da variante *D70G* do gene *BCHE*.

A amplificação foi feita de acordo com SOUZA e cols. (2005), com modificações de MIKAMI (2005), usando os seguintes iniciadores: N25 5' GGT CTG ATA TTT GGA ATG 3' e N23 5' CCA CCA TAA ATC CAT ATC 3'. As reações de amplificação foram realizadas com volume total de reação de 10 μ, sendo 9 μL de PCR supermix (Invitrogen – 22 mM Tris HCl pH 8,4; 55 mM KCl; 1,65 mM MgCl₂; 220 μM dATP; 220 μM dTTP; 220 μM dCTP; 220 μM dGTP; 22 U/mL de Taq polimerase), 1 μL de DNA (cerca de 20 ng) e 10 pmoles de cada iniciador. As PCRs ocorreram em um termociclador Techgene Ftagene 2D, com os seguintes ciclos de amplificação: a) 80 ° C por 30 segs.; b) 94 ° C por 30 segs.; c) 48 ° C por 30 segs.; d) 72° C por 30 segs.; e) repetição de 35 vezes do passo b ao d; f) 72° C por 10 min. (extensão).

3.2.3 PCR - SSCA (Análise conformacional de fita simples)

A técnica de PCR-SSCA (polymerase chain reaction – single strand conformational analysis) foi descrita primeiramente por ORITA e cols. (1989) e consiste em, após realizar a amplificação por PCR da sequência de DNA que se deseja analisar, desnaturar o produto da PCR e submetê-lo à eletroforese para análise do DNA em fita simples. Esta técnica permite que sejam observadas alterações na conformação do DNA, mesmo as que podem ter sido geradas apenas

por uma mutação de ponto. São detectadas mutações que causem uma alteração conformacional no DNA, que leve a modificar sua mobilidade eletroforética quando em fita simples.

A metodologia adaptou a descrita por SOUZA e cols. (2005) e consistiu em misturar 10 µL do produto da amplificação a 10 µL de uma solução com 95% de formamida, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol, 10mM de EDTA e 10 mM de NaOH. Em seguida, essa mistura foi colocada a 94° C por 5 minutos e mantida resfriada em gelo antes de retirar 10 µL e submetê-los à eletroforese em gel de poliacrilamida. Em cada placa de gel de poliacrilamida foram colocados dois heterozigotos *70DG* como padrões de comparação.

3.2.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O gel foi preparado a partir de uma solução estoque de poliacrilamida 29:1 (29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol e água bidestilada para um volume final de 100 mL), resultando em um gel com concentração de acrilamida de 9,0% e proporção de bisacrilamida em relação ao total de acrilamida de 3,4%.

Em seu preparo propriamente dito, foram utilizados 21mL de TBE 1X, 9 mL de poliacrilamida, 30 µL de TEMED (N, N, N', N'-tetra metiletilenodiamina) e 250 µL de persulfato de amônio (10%).

A solução tampão para preparo do gel foi de Tris-HCl 33 mM, pH 3,66. A eletroforese foi descontínua, de maneira que na cuba se usou tampão TBE 1X (Tris 54g, ácido bórico 27,5g, 20ml de EDTA 0,5 M, pH 8 e qsp 1000ml de água destilada). Os valores da voltagem e da amperagem foram mantidos constantes em 250 V e 30 mA por um tempo de corrida de 4h.

3.2.3.2 Coloração do gel

A coloração do gel foi realizada com base na metodologia descrita por BUDOWLE e cols., 1991 (*apud* MIKAMI 2005), durante a qual se manteve o gel sob agitação.

Depois da realização da eletroforese, a placa de gel foi imersa em solução de ácido nítrico (1%) durante três minutos. Após isso, foi lavada duas vezes com água destilada e imersa em solução aquosa de nitrato de prata (0,2%) e colocada por 30s. em forno microondas na potência máxima. Novamente foi lavada duas vezes com água destilada, imersa em 60 mL de solução

reveladora (170 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2,96% e 92 µL de formaldeído) e recolocada no microondas por mais 30s. quando houve o escurecimento da solução. Retirou-se o gel dessa solução e acrescentou-se o restante da solução reveladora, na qual o gel foi mantido imerso e sob agitação constante até o aparecimento das bandas.

Com a revelação terminada, o gel foi lavado duas vezes com água destilada e mantido em uma solução de ácido acético (10%) por 5 minutos. Após isto, lavou-se novamente com água destilada por duas vezes e se acresceu solução de glicerol (5%), na qual foi mantido por 10 minutos. Terminada esta etapa, se iniciou a secagem do gel, na qual este ficou embebido em solução de metanol (30%) e glicerol (1%) e foi colocado sobre papel celofane, previamente embebido na mesma solução, mantendo-o esticado para que não se formassem bolhas.

Finalmente, após a colocação sobre o celofane, o gel foi coberto com uma folha de papel filtro e colocado em uma prensa com o mesmo papel acima e abaixo dele, onde ficou até secar completamente.

Quando as placas de gel estavam completamente secas, suas imagens foram arquivadas em computador através do uso de *scanner* ou de máquina fotográfica, conforme os exemplos abaixo (Figuras 1 e 2).



Figura 1: Exemplo de gel com três amostras de heterozigotos *70DG* destacadas.

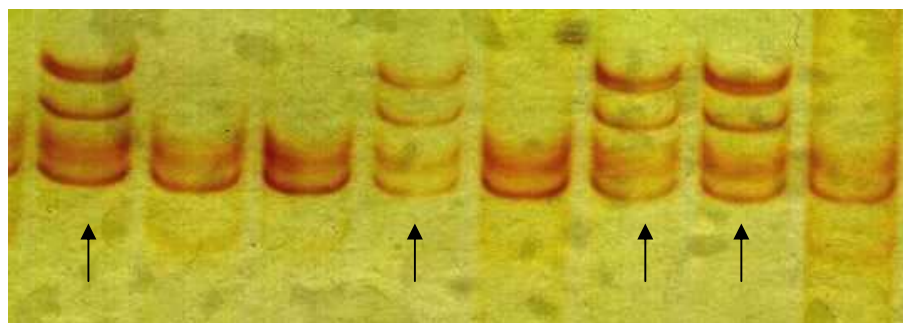


Figura 2: Região ampliada de outro gel com quatro amostras de 70DG em destaque.

3.2.4 Análise estatística dos resultados

A análise estatística foi feita com o uso do programa STATISTICA for Windows (StatSoft, Inc., 1996; <http://www.statsoft.com>). Foram calculadas distribuições de frequência, médias, desvios padrão, erros padrão e feitas comparações com a utilização dos testes: t; exato de Fisher e χ^2 .

As frequências genóticas e alélicas foram calculadas pela simples contagem. As distribuições de genótipos foram comparadas com as esperadas com base no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3.2.4.1 Odds Ratio

Pela diferença estatisticamente significativa encontrada entre Hansenianos e dados de MIKAMI e cols. (2008), calculou-se o valor de risco ($OR = odds\ ratio$), de acordo com o método de WOOLF (1955), sendo que $OR = (A \times D) / (B \times C)$, como mostrado no quadro 1.

Quadro 1: Representação esquemática do cálculo de *odds ratio*.

Genótipo	Pacientes	Amostra da população	Total
Heterozigotos (70DG)	A	B	t
Homozigotos (70DD)	C	D	z
Total	x	y	

x e y representam a soma de A+ C e B+D, respectivamente; t e z representam a soma de A+B e C+D, respectivamente.

O valor de OR mostra a chance que o grupo heterozigoto para a variante atípica da BChE apresenta de desenvolver o mal de Hansen, em relação aos dados de indivíduos usuais para a enzima. Valores de OR menores que 1, quando significativos, indicam uma menor probabilidade de se desenvolver a doença. Valores iguais a 1 não são significativos e significam que a probabilidade de desenvolvimento da doença não difere entre os grupos considerados. Entretanto, valores acima de 1 indicam que o genótipo *70DG* está associado a uma maior probabilidade de desenvolver a doença, revelando uma associação entre o fator considerado e a hanseníase.

A partir do valor de OR, pode-se calcular o Erro Padrão (EP) para o log de OR e, a partir destes dados, seu intervalo de confiança através da fórmula:

$$EP (\log OR) = \sqrt{1/A + 1/B + 1/C + 1/D}$$

Foi utilizado o intervalo de confiança (IC) de 95%, que para ser obtido, inicialmente usam-se 1,96 erros padrões em qualquer direção em relação à estimativa do log de OR. Após isto, obtém-se o antilog desses dois limites, que é o IC ao nível de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os grupos de pacientes e de controles estudados não diferem estatisticamente quanto à distribuição de sexo (teste de Fisher bicaudal: $p > 0,20$), nem quanto à distribuição étnica ($\chi^2 = 0,098$; $p > 0,95$). A distribuição étnica das duas amostras (tabelas 6 e 9) reflete aproximadamente a da população do Paraná, que segundo dados indicadores sociais do IBGE (2007), conta com 73,1% de brancos, 23,0% de pardos, 2,60% de negros e 1,2% de asiáticos e/ou indígenas.

No entanto, esses grupos apresentam diferença entre as médias de idade ($t = 2,54$; $p < 0,02$), tendo o grupo de pacientes, média mais elevada. Esta diferença não altera ou tampouco invalida os resultados, pois a divergência na idade entre os grupos não justificaria diferença de susceptibilidade à doença ou de frequência do alelo 70G.

Na amostra de pacientes encontraram-se 10 heterozigotos para a variante atípica (70G) da butirilcolinesterase: 6 entre os afetados com a forma multibacilar (52 indivíduos) e 4 entre os pacientes com a forma paucibacilar (35 indivíduos). As frequências genotípicas e alélicas, com os respectivos erros padrão, encontradas entre os pacientes, podem ser visualizadas na tabela 10 e no gráfico 1.

Tabela 10: Frequências genotípicas e do alelo 70G nas formas clínicas dos pacientes hansenianos.

Forma Clínica	Genótipo 70DG (%)	Alelo 70G (%)	Número de indivíduos
Multibacilar	$11,5 \pm 4,4$	$5,8 \pm 2,3$	52
Paucibacilar	$11,4 \pm 5,4$	$5,7 \pm 2,8$	35
Total	$11,5 \pm 3,4$	$5,8 \pm 1,8$	87

As comparações das frequências do genótipo 70DG e do alelo 70G entre as formas clínicas da hanseníase, através do teste exato de Fisher bicaudal, mostraram que elas não diferem ($p = 1,0$ nas duas comparações) entre esses grupos.

Nos controles, foram encontrados três indivíduos com a mutação D70G, sendo 2 deles heterozigotos (frequência do genótipo 70DG = 2,30%) e 1 deles homozigoto atípico (frequência do genótipo 70GG = 1,15%). A frequência do alelo 70G no grupo de controles é $2,3\% \pm 1,1\%$.

As frequências genotípicas e alélicas de pacientes e controles podem ser vistas no gráfico 2.

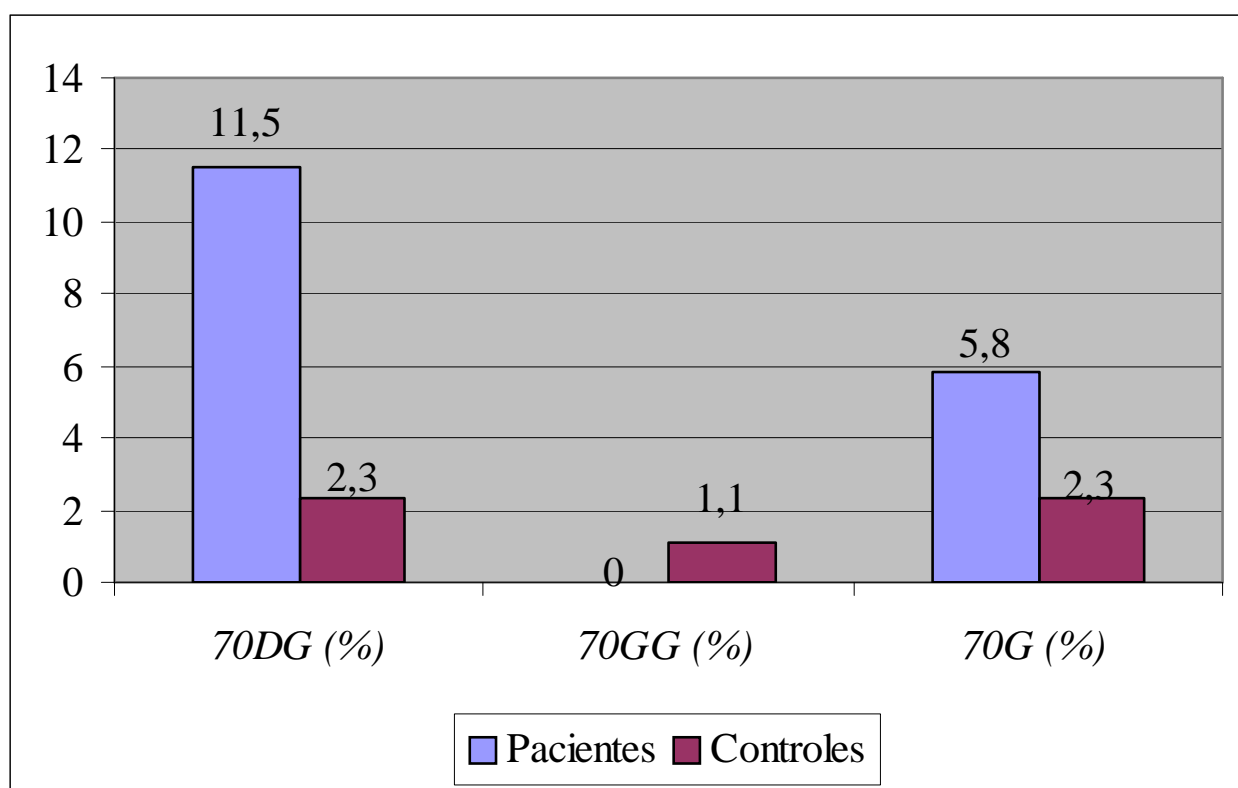
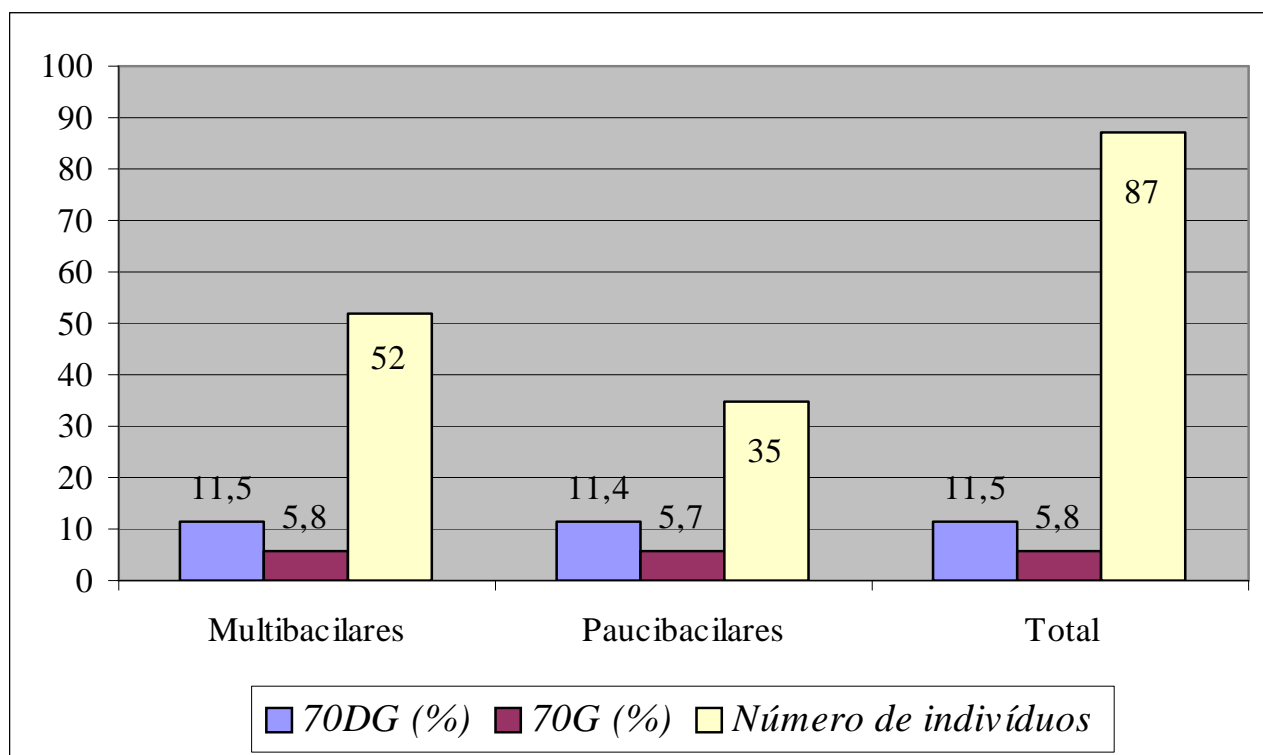


Gráfico 1: Frequências do alelo 70G e de heterozigotos (70DG) em pacientes hansenianos, considerando-se formas clínicas da doença.

Gráfico 2: Frequências (%) de heterozigotos (*70DG*), de homozigotos atípicos (*70GG*) e do alelo *70G* entre pacientes e controles.

Quando as distribuições de frequências genotípicas (somando-se os casos de hetero e homozigotos com *70G*) e alélicas foram comparadas entre pacientes e controles, pelo teste exato bicaudal de Fisher, as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p = 0,08$ e $p > 0,15$, respectivamente). Esse resultado pode ter sido influenciado pelo pequeno tamanho da amostra. Considerando-se que esse estudo foi realizado em função de estudos anteriores, que sugeriram frequência mais elevada de *70G* em hansenianos do que em pessoas sem a doença, poderia se adotar o resultado do teste unicaudal de Fisher, que resultou em $p = 0,04$ e $p = 0,08$, respectivamente, estatisticamente significativo quanto à comparação entre as distribuições genotípicas e relativamente próximo do nível limite de significância, no caso da comparação entre as distribuições de frequências alélicas.

As diferenças de frequências entre as duas amostras foram minimizadas pelo fato de se ter encontrado um homozigoto atípico (*70GG*) entre os controles que, por possuir dois alelos *70G*, eleva sua frequência, diminuindo a diferença entre os grupos. A probabilidade de que se encontrasse um indivíduo *70GG* nessa amostra de controles era muito baixa, pois sua frequência na população é de cerca de um caso em 2.500 indivíduos (0,04%). Enquanto a amostra dos pacientes encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg quanto à distribuição genotípica ($\chi^2 = 0,327$; $p > 0,5$), a dos controles, em virtude desse homozigoto, não se encontra em tal equilíbrio ($\chi^2 = 20,69$; $p < 0,001$).

Considerando-se o desequilíbrio de Hardy-Weinberg encontrado e também que esse controle homozigoto é filho de uma paciente com hanseníase, não estudada na presente amostra, retirou-se, portanto, este homozigoto da amostra de controles, que passaria a ter duas mutações no grupo de 86 pessoas, o que levaria ao equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,012$; $p > 0,80$) e à frequência alélica de *70G* igual a $1,16\% \pm 0,81\%$.

Comparando-se as amostras com a exclusão desse homozigoto, encontram-se diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes e controles quanto às distribuições genotípicas e alélicas, pois mesmo o teste exato de Fisher bicaudal mostra resultados de $p = 0,032$ e de $p = 0,035$, respectivamente.

Confrontando os dados dos hanzenianos com os dados de uma amostra de 361 euro-brasileiros doadores de sangue da população geral do Paraná (MIKAMI e cols., 2008), verificam-se diferenças estatisticamente significativas: $\chi^2 = 8,73$, com $p < 0,01$, quanto à comparação entre as distribuições genotípicas, e $p < 0,01$ quanto à comparação entre as frequências alélicas pelo teste exato de Fisher bicaudal. Os dados de MIKAMI e cols. (2008) se referem a 13 heterozigotos (3,60%), com frequência de 1,8% da variante 70G. Vale dizer que, embora a amostra de MIKAMI e cols. (2008) seja composta apenas de euro-brasileiros, ainda é um controle apropriado para essa comparação, pois 84,6% das variantes atípicas da presente amostra foram encontradas em indivíduos de etnia euro-brasileira. Além disso, não há evidências de que o mal de Hansen afete preferencialmente uma determinada etnia e a variante atípica é mais frequente em euro-brasileiros, sendo que sua ocorrência em afro-brasileiros foi considerada como devida à miscigenação desse grupo étnico com europeus (CHAUTARD-FREIRE-MAIA e cols., 1984). Dessa forma, não se esperaria que a variante atípica estivesse com frequência relativamente diminuída nesta amostra de MIKAMI e cols. (2008), o que a torna um controle com um bom grau de rigor.

Com base nesses dados foi calculado o valor de *odds ratio*, comparando-se a distribuição de genótipos selvagens e heterozigotos 70DG encontrados no presente estudo, com os de MIKAMI e cols. (2008). Foi encontrado, com um intervalo de confiança de 95%, um valor de *odds ratio* significativo de 3,48, com intervalo de confiança entre 1,47 - 8,22, o que significa que o heterozigoto para a variante atípica da BChE tem uma probabilidade cerca de três vezes maior de desenvolver o mal de Hansen do que os homozigotos selvagens.

Dessa maneira, o presente trabalho corrobora os estudos que sugeriram associação entre a variante atípica da BChE e a susceptibilidade ao Mal de Hansen.

Entretanto, não é possível afirmar conclusivamente se a associação verificada é decorrente da variante 70G da BChE, pois é possível que seja com outra variante como a D70H (BOECK e cols., 2002), que se origina de uma mutação de ponto no nucleotídeo 208 (tabela 1), na mesma trinca que a D70G, substituindo um ácido aspártico (GAT) por uma histidina (CAT) e, dessa forma, tendo uma afinidade reduzida por substratos positivamente carregados. Vale ressaltar, contudo, que não há trabalhos sobre a frequência populacional da variante D70H, que pode ser uma variante extremamente rara e, no caso, dificilmente seria a responsável pela associação verificada. Na sequência do presente trabalho, os indivíduos identificados como heterozigotos e o único homozigoto para a mutação atípica, terão essa região do exon 2 sequenciada para excluir

a possível ocorrência da variante *D70H*, levando-se em conta a possibilidade de que a PCR-SSCA, nas condições utilizadas, possa não discernir entre essas duas mutações.

Outra variante a considerar seria a *K* (*539T*) do exon 4 (BARTELS e cols., 1992b), que devido ao desequilíbrio de ligação é encontrada preferencialmente na conformação cis com *70G*. A variante *-116A* do exon 1, o qual não é codificador, também se encontra preferencialmente na conformação cis com a variante *K* (BARTELS e cols., 1990), sendo que *-116A* foi associada à diminuição de cerca de 30% na atividade da BChE (FURTADO e cols., 2008). NUNES (2007), ao examinar heterozigotos para as variantes *-116A*, *70G* e *539T* mostrou que *70G* está geralmente na conformação cis com *-116G* (variante selvagem). Dessa forma, levando-se em conta que *-116A* está associada com atividade mais baixa da BChE, e quase sempre junto com *539T*, será interessante, na sequência deste trabalho, examinar também essas variantes para verificar qual o haplótipo seria mais freqüente nos pacientes em relação aos sítios -116, 70 e 539.

Além disso, a associação com variante do gene *BCHE* pode apenas ser indicativa de relação de outro gene com a hanseníase, com variante em desequilíbrio de ligação com a atípica do gene *BCHE*. Nesse contexto, é interessante registrar que MIRA e cols. (2003), ao analisarem ligação de 20 microssatélites em indivíduos com hanseníase, usaram dois marcadores localizados em 3p21, sendo que os escores lod foram de 1,31 e de 0,63, com relação aos microssatélites D3S2409 e D3S1766, respectivamente, não indicando ligação genética nessa região do cromossomo 3, que é relativamente distante da localização do gene *BCHE* (3q26.1-q26.2).

Admitindo-se que o risco de susceptibilidade à hanseníase se deva a variantes da BChE, a razão fisiológica desta relação permanece inexplicada. KAWASHIMA E FUJII (2000) relatam a existência de um sistema colinérgico extra-neuronal na regulação das células do sistema imune, uma vez que leucócitos mononucleares são responsáveis pela síntese de cerca de 60% da acetilcolina presente no sangue. Além disso, nesse mesmo estudo, é mostrado que linfócitos T podem ser estimulados por fitohemaglutinina a produzir acetilcolina, levando ao aumento de síntese de colina, de colina acetiltransferase, de acetilcolinesterase e de receptores colinérgicos. A colina acetiltransferase é responsável pela síntese da acetilcolina, enquanto a acetilcolinesterase atua na hidrólise da acetilcolina, gerando colina e ácido acético. Considerando que os linfócitos T fazem contato direto com as células alvo, espera-se que mesmo uma pequena quantidade de acetilcolina, liberada destes linfócitos ativados, possa interagir com os receptores da célula alvo (KAWASHIMA E FUJII, 2000). Com base em dados de diminuição de

acetilcolina em órgãos linfóides e em leucócitos mononucleares de ratos espontaneamente hipertensos, que apresentavam deficiência de função das células T, esses autores sugeriram que a acetilcolina agiria como um fator autócrino e/ou parácrino de regulação da função imune.

A relação da acetilcolina com o sistema imune poderia ser uma das razões fisiológicas da relação entre a BChE e a hanseníase, no sentido de que uma enzima variante, como a atípica, com menos afinidade pela acetilcolina, pudesse interferir no sistema de sua regulação imune.

Além dos dados anteriores, é interessante assinalar que no estudo de MAHMOUD e cols. (2003) foi mostrado que baixos níveis de atividade da BChE estariam relacionados com uma alteração no sistema imune em mulheres grávidas com hipertensão induzida pela gravidez, que apresentaram correlações negativas entre a percentagem de células CD4+CD25+ e CD8+CD25+ e a atividade da BChE. A interpretação desses autores é que um baixo nível de atividade da BChE prejudicaria a hidrólise de toxinas ambientais, aumentando o número de células do sistema imune e contribuindo para o desenvolvimento da hipertensão.

LEPIENSKI e cols. (2006) mostraram associação entre a variante *K* (539T) e o aparecimento precoce de diabetes do tipo 1, sendo que OLIVEIRA (2006), estudando as mesmas amostras, mostrou que essa associação só ocorre quando a variante *K* está em cis com a variante -116A, do exon 1 do gene *BCHE*, a qual foi associada a menor atividade da BChE (FURTADO e cols., 2008).

Esses trabalhos mostram associação entre atividade mais baixa da BChE e doenças relacionadas ao sistema imune. No caso da Hanseníase, isso possivelmente se deve pela menor eficácia na remoção de toxinas que a variante atípica *D70G* da BChE realiza no organismo. Entretanto, estudos com as demais variantes da BChE e com uma amostra mais representativa da população, são necessários para uma melhor elucidação da relação entre a variante atípica e a hanseníase. O fato de não terem sido encontradas diferenças quanto à frequência de *D70G* nas duas formas clínicas, sugere que a associação entre BChE e hanseníase não se refere ao desenvolvimento da doença, mas sim ao risco de contraí-la.

5. CONCLUSÃO

1. Considerando-se a mutação atípica (*D70G*) da butirilcolinesterase, em 87 afetados pelo mal de Hansen e em seus 87 controles, obtiveram-se as seguintes frequências: em pacientes: $11,5 \pm 3,4\%$ heterozigotos e $5,8 \pm 1,8\%$ do alelo *70G*; em controles: $2,30 \pm 1,6\%$ heterozigotos, $1,2 \pm 1,1\%$ homozigotos e $2,3\% \pm 1,1\%$ de *70G*.
2. Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de heterozigotos atípicos entre 35 pacientes paucibacilares e 52 multibacilares, sendo respectivamente: $11,4 \pm 5,4\%$ e $11,5 \pm 4,4\%$.
3. Pacientes e controles só diferiram significativamente nas frequências genotípicas, quando comparadas pelo teste unicaudal de Fisher ($p = 0,04$).
4. Comparando-se os dados dos hansenianos com os de uma amostra de 361 doadores de sangue euro-brasileiros do Paraná (MIKAMI e cols., 2008), verificam-se diferenças estatisticamente significativas quanto às distribuições genotípicas ($p < 0,01$) e quanto às frequências alélicas ($p < 0,01$), sendo as do presente estudo mais elevadas.
5. O valor de *odds ratio*, comparando-se a distribuição de genótipos selvagens e heterozigotos *70DG* encontrados no presente estudo, com os encontrados no estudo de MIKAMI e cols. (2008), foi de 3,48, com intervalo de confiança de 1,47 a 8,22, significando que o heterozigoto para a variante atípica da BChE tem uma probabilidade cerca de três vezes maior de desenvolver o mal de Hansen do que os homozigotos selvagens.
6. O presente trabalho corrobora os estudos que sugeriram associação entre a variante atípica da BChE e a susceptibilidade ao Mal de Hansen. O fato de não terem sido encontradas diferenças quanto à frequência de *D70G* nas duas formas clínicas, sugere que a associação entre BChE e hanseníase não se refere ao desenvolvimento da doença, mas sim ao risco de contraí-la.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L.; DEMENASIS, F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 42, p.256-266, 1988.

ABEL, L.; SANCHEZ, F.O.; OBERTI, J.; THUC, N.V.; HOA, L.V.; LAP, V.D.; SKAMENE, E.; LAGRANGE, P.H.; SCHURR, E. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 133-145, 1998.

ALCAIS, A.; SANCHEZ, F.O.; THUC, N.V.; LAP, V.D.; OBERTI, J.; LAGRANGE, P.H.; SCHURR, E.; ABEL, L. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 302-308, 2000.

ALLES, G.A.; HAWES, R.C. Cholinesterases in the blood of man. **J. Biol. Chem.**, v. 133, p. 375-390, 1940.

AGARWAL, D.P.; GOEDDE, H.W.; SCHLOOT, W. A note on atypical serum cholinesterase and genetic factors in leprosy. **Hum. Hered.**, v. 23, p. 370-373, 1973.

BARTELS, C.F.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LA DU, B.N. Two polymorphisms in the non coding regions of the *BCHE* gene. **Nucl. Acids Res.**, v. 18, p. 6171, 1990.

BARTELS, C.F.; JAMES, K.; LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 50, p. 1104-1114, 1992a.

BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.L.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T.; LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 50, p. 1086-1103, 1992b.

BEIGUELMAN, B. Genetics and leprosy. **Ciênc. saúde coletiva.**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 117-128, 2002.

BENNETT, J.C.; PLUM, F. **Tratado de medicina interna**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1997.

BOECK, A.T.; FRY, D.L.; SASTRE, A.; LOCKRIDGE, O. Naturally occurring mutation, Asp70His, in human butyrylcholinesterase. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 39, p. 154-156, 2002.

BOURNE, J.C.; COLLIER, H.O.J.; SOMERS, G.F. Succinylcholine (succinoyl-choline) muscle-relaxant of short action. **Lancet**, v. 1, p. 1225-1229, 1952.

BOTGARD disponível em:
<<http://www.botgard.ucla.edu/html/botanytextbooks/economicbotany/Curare/>>. Acesso em 04 de fevereiro de 2007.

BOVET, D. The relationships between isosterism and competitive phenomena in the field of drug therapy of the autonomic nervous system and that of the neuromuscular transmission, 1957. Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964. The Official Web Site of The Nobel Foundation: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1957/bovet-lecture.html

BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI, A. M.; EISENBERG, A.J.; ALLEN, R.C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by right-resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet.**, Berlin, v. 48, p. 137-144, 1991.

BULAKH, P.M.; RANADE, S.M.; CHANDORKAR, A.G.; MULEY, P.R. Correlation between serum choline esterase and serum albumin in leprosy. **Indian J. Lepr.**, v. 57, p. 524–528, 1985.

CHAKRAVARTTI, M.R.; VOGEL, F. **A twin study on leprosy**, Stuttgart: Georg Thieme, 1973.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; LOURENÇO, M.A.C.; CULPI, L. Frequencies of atypical serum cholinesterase among Caucasians and Negroes from Southern Brazil. **Human Heredity**, Basel, v. 34, p. 388-392, 1984.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; SOUZA, R.L.R. **Butyrylcholinesterase - a still mysterious enzyme**. In: Fifty Years of Human Genetics - A festschrift and liber amicorum to celebrate the life and work of George Robert Fraser. Wakefield Press, Adelaide, 2007.

DEY, D.C.; KANNO, T.; SUDO, K.; MAEKAWA, M. Genetic analysis of 6 patients with no detectable butyrylcholinesterase activity – three novel silent genes and heterogeneities of mutations in *BCHE* gene in Japan. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 61, p.2307, 1997. Suplemento.

DEY, D.C.; MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T. Butyrylcholinesterase genes in individuals with abnormal inhibition numbers and with trace activity: one common mutation and two novel silent genes. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 5, p. 302-310, 1998.

EVANS, F.T.; GRAY, P.W.S.; LEHMANN, H.; SILK, E. Sensitivity to succinylcholine in relation to serum-cholinesterase. **Lancet**, v. 1, p. 1229-1230, 1952.

FEITOSA, M.F.; BORECKI, I.; KRIEGER, H.; BEIGUELMAN, B.; RAO, D.C. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 56, p.1179-1185, 1995.

FORBAT, A.; LEHMANN, H.; SILK, E. Prolonged apnoea following injection of succinylcholine. **Lancet**, v. 2, p. 1067-1068, 1953.

FURTADO, L.; ANDRADE, F.A.; NUNES, K.; MIKAMI, L.R.; SOUZA R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of the -116A variant of the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase to lower means of enzyme activity and body mass index. **Chemico-Biological Interactions**, 2008 (enviado para publicação).

GÄTKE, MR.; OSTERGAARD, J.R.; BUNDGAARD, J.R.; VARIN, F.; VIBY-MOGENSEN, J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for novel and a known mutation in the butyrylcholinesterase gene: genotyping by sequencing. **Anesthesiol.**, v. 95, n. 3, p. 600-606, 2001.

GNATT, A.; PRODY, C.A.; ZAMIR R.; LIEMAN-HURWITZ, J.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger-RNA transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous-system tumors. **Cancer Research**, v. 50, p. 1983-1987, 1990.

GREENBERG, C.P.; PRIMO-PARMO, S.L.; PANTUCK, E.J.; LA DU, B.N. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotyping methods. **Anesth. Analg.**, Cleveland, v. 81, p. 419-421, 1995.

HADA, T.; MURATANI, K.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; MORIWAKI, Y.; ITOH, M.; AMURO, Y.; HIGASHINO, K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cyrrhosis. **Intern. Med.**, Tokyo v. 31, p. 357-362, 1992.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; OHHARA, M.; SHODA, T.; PRIMO-PARMO, S. L.; LA DU, B. N. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. **Japan. J. Clin. Pathol.**, v. 40, p. 535-540, 1992.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; TOMITA, M.; WATANABE, Y.; MINATOGAWA, Y.; IWASAKI, K.; GOTOH, K.; SHIMIZU, C. Genetic analysis of a Japanese patient with butyrylcholinesterase deficiency. **Ann. Hum. Genet.**, v. 61, p. 491-496, 1997a.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; UEDA, N.; HUKANO, K. Nonsense mutation in exon 2 of the butyrylcholinesterase gene: a case of familial cholinesterasemia. **Clin. Chim. Acta**, v. 261, p. 27-34, 1997b.

HIDAKA, K.; WATANABE, Y.; TOMITA, M.; UEDA, N.; HIGASHI, M.; MINATOGAWA, Y.; IUCHI, I. Gene analysis of genomic DNA from stored serum by polymerase chain reaction: identification of three missense mutations in patients with cholinesterasemia and ABO genotyping. **Clin. Chim. Acta**, v. 303, p. 61-67, 2001.

IBGE disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Indicadores_Sociais/Sintese_de_Indicadores_Sociais_2007/Tabelas
Acesso em 11 de novembro de 2007.

ISCID disponível em: <<http://www.iscid.org/encyclopedia/Xenobiotics>>. Acesso em 03 de fevereiro de 2007.

JENSEN, F.S.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. **Pharmacogenetics**, London v. 2, p. 234-240, 1992.

KALOW, W. Familial incidence of low pseudo-cholinesterase level. **Lancet**, v. 2, p. 576-577, 1956.

KALOW, W.; GENEST, K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, Ottawa, v. 35, p. 339-346, 1957.

KALOW, W.; STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, Ottawa, v. 35, p. 1305-1320, 1957.

KANG, T.J.; CHAE, G.T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 31, p. 53-58, 2001.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, p. 29-48, 2000.

KUTTY, K. M. Review: Biological function of cholinesterase. **Clin. Biochem.**, Toronto, v.13, p.239-243, 1980.

LEPIENSKI, L.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; SOUZA, R.L.R.; ALCÂNTARA, V.M.; RÉA, R.R. Variant K of butyrylcholinesterase and risk of early-onset type 1 diabetes mellitus in Euro-Brazilians. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 8, p. 709–711, 2006.

LEVANO, S.; GINZ, H.; SIEGEMUND, M.; MIODRAG, F.; VORONKOV, E.; URWYLER, A.; GIRARD, T. Genotyping the butyrylcholinesterase in patients with prolonged neuromuscular block after succinylcholine. **Anesthesiology**, v. 102, p. 531–535, 2005.

LIU, W.; CHENG, L.; IWASAKI, A.; IMANISHI, H.; HADA, T. Novel mutation and multiple mutation found in human butyrylcholinesterase gene. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 326, p.193-199, 2002.

LU, W.D.; HADA, T.; FUKUI, K.; IMANISHI, H.; MATSUOKA, N.; IWASAKI, A.; HIGASHINO, K. Familial hypocholinesterasemia found in a family and a new confirmed mutation. **Intern. Med.**, v. 36, p. 9-13, 1997.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M.; ETOH, K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 235, p.41-57, 1995.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M. Genetic mutation of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. **Clin. Chem.**, New York, v. 43, p. 924-929, 1997.

MAEKAWA, M.; TANIGUCHI, T.; ISHIKAWA, J.; TOYODA, S.; TAKAHATA, N. Problem with detection of an insertion-type mutation in the *BCHE* gene in a patient with butyrylcholinesterase deficiency. **Clin.Chem.**, v. 50, p. 2410-2411, 2004.

MAHMOUD, F.; HAINES, D.; ABUL, H.; OMU, A. Butyrylcholinesterase activity and pregnancy-associated differences in immunologically relevant peripheral blood leukocyte populations. **Am J Reprod Immunol.**, v. 50, p. 77–82 , 2003.

MANOHARAN, I.; WIESELER, S.; LAYER, P.G.; LOCKRIDGE, O.; BOOPATHY, R. Naturally occurring mutation Leu307Pro of human butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. **Pharmacogenet Genomics**, v. 7, p. 461-468, 2006

McGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, A.H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 953-957, 1989.

MIKAMI, L.R. **Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene *BCHE* e sua relação com a atividade da butirilcolinesterase**. Curitiba, 2005. 181f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MIKAMI, L.R.; WIESELER, S.; SOUZA, R.L.; SCHOPFER, L.M.; NACHON, F.; LOCKRIDGE, O.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. **Pharmacogenetics and Genomics**, 2008 (*no prelo*).

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F.; A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 1215, 1988.

MIRA, M.T.; ALCAIS, A.; VAN THUC, N.; THAI, V.H.; HUONG, N.T.; BA, N.N.; VERNER, A.; HUDSON, T.J.; ABEL, L.; SCHURR, E. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nat. Genet.**, v. 33, p. 412-415, 2003.

MIRA, M.T.; ALCAIS, A.; NGUYEN, V.T.; MORAES, M.O.; DI FLUMERI, C.; VU, H.T.; MAI, C.P.; NGUYEN, T.H.; NGUYEN, N.B.; PHAM, X.K.; SARNO, E.N.; ALTER, A.; MONTPETIT, A.; MORAES, M.E.; MORAES, J.R.; DORE, C.; GALLANT, C.J.; LEPAGE, P.; VERNER, A.; VAN DE VOSSE, E.; HUDSON, T.J.; ABEL, L.; SCHURR, E. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, p. 636-640, 2004.

MIRA, M.T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1124-1131, 2006.

MURATANI, K.; HADA, T.; YAMAMOTO, Y.; KANEKO, T.; SHIGETO, Y.; OHUE, T.; FURUYAMA, J.; HIGASHINO, K. Inactivation of the cholinesterase gene by Alu insertion: possible mechanism for human gene transposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington v. 88, p. 11315-11319, 1991.

NOGUEIRA, C.P.; McGUIRE, M.C.; GRASER, C.; BARTELS, C.F.; ARPAGAU, M.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, Gly 117 (GGT → GGAG). **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 46, p. 934-342, 1990.

NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; McGUIRE, M.C. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 51, p. 821-828, 1992.

NUNES, K. **Haplótipos do gene *BCHE* da butirilcolinesterase humana e aspectos evolutivos**. Curitiba, 2007. 136f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

OLIVEIRA, L.C. **Investigação de associação das variantes do nucleotídeo –116 do gene *BCHE* da butirilcolinesterase em diabete melito tipo 1**. Curitiba, 2006. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

ON-KEI CHAN, A.; LAM, C.W.; TONG, S.F.; MAN TUNG, C.; YUNG, K.; CHAN, Y. W.; AU, K.M.; YUEN, Y.P.; HUNG, C.T.; NG, K.P.; SHEK, C.C. Novel mutations in the *BCHE* gene in patients with no butyrylcholinesterase activity. **Clin. Chim. Acta**, v. 351, p. 155-159, 2005.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detections of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 96, p. 2766 – 2770, 1989.

PARMO-FOLLONI, F.; NUNES, K.; LEPIENSKI, L.M.; MIKAMI, L.; SOUZA, R.R.L.; TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Two new mutations of the human *BCHE* gene (*IVS3-14T>C* and *L574fsX576*). **Chemico-Biological Interactions**, 2008 (enviado para publicação).

PRIMO-PARMO, S.L.; BARTELS, C.F.; WIERSAMA, B.; VAN DER SPEK, A.F.L.; INNIS, J.W.; LA DU, B.N. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 58, p. 52-64, 1996.

PRIMO-PARMO, S.L.; LIGHSTONE, H.; LA DU, B.N. Characterization of an unstable variant (BChE115D) of human butyrylcholinesterase. **Pharmacogenetics**, London, v. 7, p. 27-34, 1997.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 34, p. 255-273, 1966.

ROY, S.; FRODSHAM, A.; SAHA, B.; HAZRA, S.K.; MASCIE-TAYLOR, C.G.; HILL, A.V. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **J Infect Dis**, v.179, p.187-191, 1999.

SAKAMOTO, N.; HIDAKA, K.; FUGISAWA, T.; MAEDA, M.; IUCHI, I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase - a case of familial cholinesterasemia. **Clin. Chim. Acta.**, Amsterdam, v. 274, p. 159-166, 1998.

SAÚDE disponível em <<http://www.saude.pr.gov.br/Hanseníase/index.html>>. Acesso em 16/02/07.

SIDDIQUI, M.R.; MEISNER, S.; TOSH, K.; BALAKRISHNAN, K.; GHEI, S.; FISHER, S.E.; GOLDING, M.; SHANKER NARAYAN, N.P.; SITARAMAN, T.; SENGUPTA, U.; PITCHAPPAN, R.; HILL, A.V. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. **Nat. Genet.**, v. 27, p. 439-441, 2001.

SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 325-334, 1997.

SOUZA, R.L.R. **Variação fenotípica e genotípica da butirilcolinesterase humana e sua relação com altura e índice de massa corporal**. Curitiba, 2001. 146f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SOUZA, R.L.R.; MIKAMI, L.R.; MAEGAWA, R.O.B.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Four new mutations in the *BCHE* gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 84, p. 349-353, 2005.

SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; KANNO, T. Three different point mutation in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype. **Clin. Biochem.**, Toronto, v. 29, n. 2, p. 165-169, 1996.

SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; OGASAWARA, H.; TANAKA, T. Human butyrylcholinesterase L3301 mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 240, p. 372-375, 1997.

SUNEETHA, L.M.; BAHUMATHY, C.D.; SOLOMON, S.S.; SUNEETHA S.; KORULA R.J.; BALASUBRAMANIAN, A.S. Cholinesterase in leprosy nerves: A preliminary report. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 70, p. 208-210, 2002.

SUNEETHA, L.M., KARUNAKAR, V.; MEHERVANI; KAURNA; REDDY, R.G, SUNEETHA, S. Serum butyrylcholinesterase activity in leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 72, p. 324-326, 2004.

TAKAGI, H.; NARAHARA, A.; TAKAYAMA, H.; SHIMODA, R.; NAGAMINE, T.; MORI, M. A new point mutation in cholinesterase: relationship between multiple mutation sites and enzyme activity. **Int. Hepat. Comm.**, v. 6, p. 288-293, 1997.

THOMAS, M.; JOB, C. K. Serum atypical pseudocholinesterase and genetic factors in leprosy. **Brit. med. J.**, v. 3, p. 390-391, 1972.

THOMAS, M.; JOB, C.K.; KURIAN, P.V. Susceptibility to leprosy and serum atypical pseudocholinesterase. **Int. J. Lep.**, v 44, n. 3, p. 315-318, 1976.

WHITTAKER, M.; LOWE, R.F.; ELLIS, B.P.B. Serum cholinesterase variants in African leprosy patients resident in Rhodesia. **Hum. Hered.**, v. 26, p.372-379, 1976.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anaesthesia**, London, v. 35, p.174-197, 1980.

WHITTAKER, M. **Cholinesterase**. New York: Karger, 1986.

WHO disponível em <<http://www.who.int/lep/situation/BurdenEnd2005.pdf>>. Acesso em 16/08/07.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chemotherapy of leprosy for control programmes**. WHO, Geneva, Technical Report Series, n. 675, 1982.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Ann. Hum. Genet.**, v. 19, p. 251-253, 1955.

YEN, T.; NIGHTINGALE, B.N.; BURNS, J.C.; SULLIVAN, D.R.; STEWART, P.M. Butyrylcholinesterase (BChE) genotyping for post-succinylcholine apnea in an Australian population. **Clin. Chem.**, v. 49, p. 1297-1308, 2003.